

細胞膜上の分子認識を介して細胞機能进行操作する生体模倣合成高分子の創製

著者	中川 泰宏
内容記述	この博士論文は内容の要約のみの公開（または一部非公開）になっています
発行年	2018
学位授与大学	筑波大学 (University of Tsukuba)
学位授与年度	2017
報告番号	12102甲第8494号
URL	http://hdl.handle.net/2241/00152378

数理物質科学研究科 博士論文の要約

専攻名 物質・材料工学専攻

学籍番号 201530125

学生氏名 中川 泰宏

学位名 博士(工学)

指導教員 荏原 充宏 印

博士論文題目

細胞膜上の分子認識を介して細胞機能进行操作する生体模倣合成高分子の創製

1章 緒言

2章 アポトーシス細胞膜を模倣した抗炎症活性を有する高分子の設計

3章 アポトーシス細胞模倣高分子の汎用高分子への応用

4章 糖認識機能を有するレクチン模倣高分子の作製

5章 結言

1章 緒言

生体において、分子認識は生物学的プロセスの基本にして必須の相互作用である。呼吸、代謝、タンパク質産生、免疫などの生体の自己恒常性維持に不可欠な生体活動の根幹には、ATP-酵素、レセプター-リガンド、DNA-タンパク質、RNA-リボソーム、抗原-抗体、糖-レクチンなどの様々な分子認識機構が存在する(Figure 1)。生体分子認識を我々に利するように制御する物質は薬剤として開発され、今日では様々な場面で活用されている。例えば、抗がん剤として知られているシスプラチンはDNA中のグアニン-アデニン間を強力に架橋し、二重螺旋の開裂を防ぐことでDNAの複製を阻害し、癌細胞の増殖を阻害する。この他にも、抗生物質、抗アレルギー剤、ホルモン剤、免疫抑制剤など様々な薬剤が知られており、その全てが何らかの形で生体分子認識を制御している。加えて近年では、薬剤と高分子材料を複合することで薬理活性の高機能化が達成されている。この概念によって作製される高分子・薬剤・高分子・ミセル・高分子・リポソーム複合体はポリマーナノメディシンと呼ばれ、分子量の向上による血中滞留性の向上やEPR効果による腫瘍組織へ対する指向性の獲得が達成されている。

このような高分子・薬剤複合化による成功のもと高分子材料の次なる戦略として、自身が生理活性を有し、これを通して治療効果を誘導することが可能な材料の創出が提唱されている。この枠組みは高分子材料を単なる運び手としてではなく、能動的な治療効果発現の担い手として見るという点で革新的である一方で、高分子設計においてはより厳密に生体の分子認識に寄り添う必要がある。この概念は2010年にKopečekによって実証された。Kopečekらは高分子(poly-HPMA)、Anti-CD20抗体、CCE/CCKペプチドを用いることでB細胞に発現しているCD20を多量化することでB細胞にアポトーシスを誘導した。このアプローチはそれ単体でも従来の治療法である化学療法や免疫療法よりも大きな利点を有するだけでなく、既存の治療法と組み合わせることでさらなる相乗効果が期待できる。

一方で、高分子を生体内で活用するという視点から考えると、生体分子を模倣するという材料設計戦略も効果的である。代表的な例として、細胞膜の主要構成性成分であるホスファチジルコリンの頭部基であるホスホリルコリン基を側鎖に有するpoly-MPS(2-Methacryloyloxyethyl Phosphorylcholine)が優れた生体適合性を示すということは広く知られている。MPCの優れた点は生体適合性だけでなく機械的安定性や汎用性

の高さも優れており、人工関節、ステント、補助人工心臓、人工肺、ソフトコンタクトレンズ等、医療分野を始めとした様々な商品分野において活用されている。加えて、工業ベースでの生産による多産性とそれに伴った低コスト化も多用な分野での応用を可能とする大きな要素であり、機能性高分子の目指す所である。

このような背景のもと、著者は自身が生体分子認識機能、及び生理的活性を有する高分子材料の創出を本研究の主題とした。第2章では免疫細胞に対して生理活性を有する生体分子としてホスファチジルセリンに着目し、ホスファチジルセリンの機能性官能基を有するメタクリル系モノマーの開発を行い、高分子の分子設計による高機能化について述べる。第3章ではさらなる機能化を目指して非ラジカル重合系の高分子材料に対して導入手法を開発した。第4章では抗菌剤として活用されており、且つ *cis*-diol と特異的に共有結合を形成することで知られている *Benzoxaborole* 基を重合性官能基化し、これの糖認識機能を評価した。

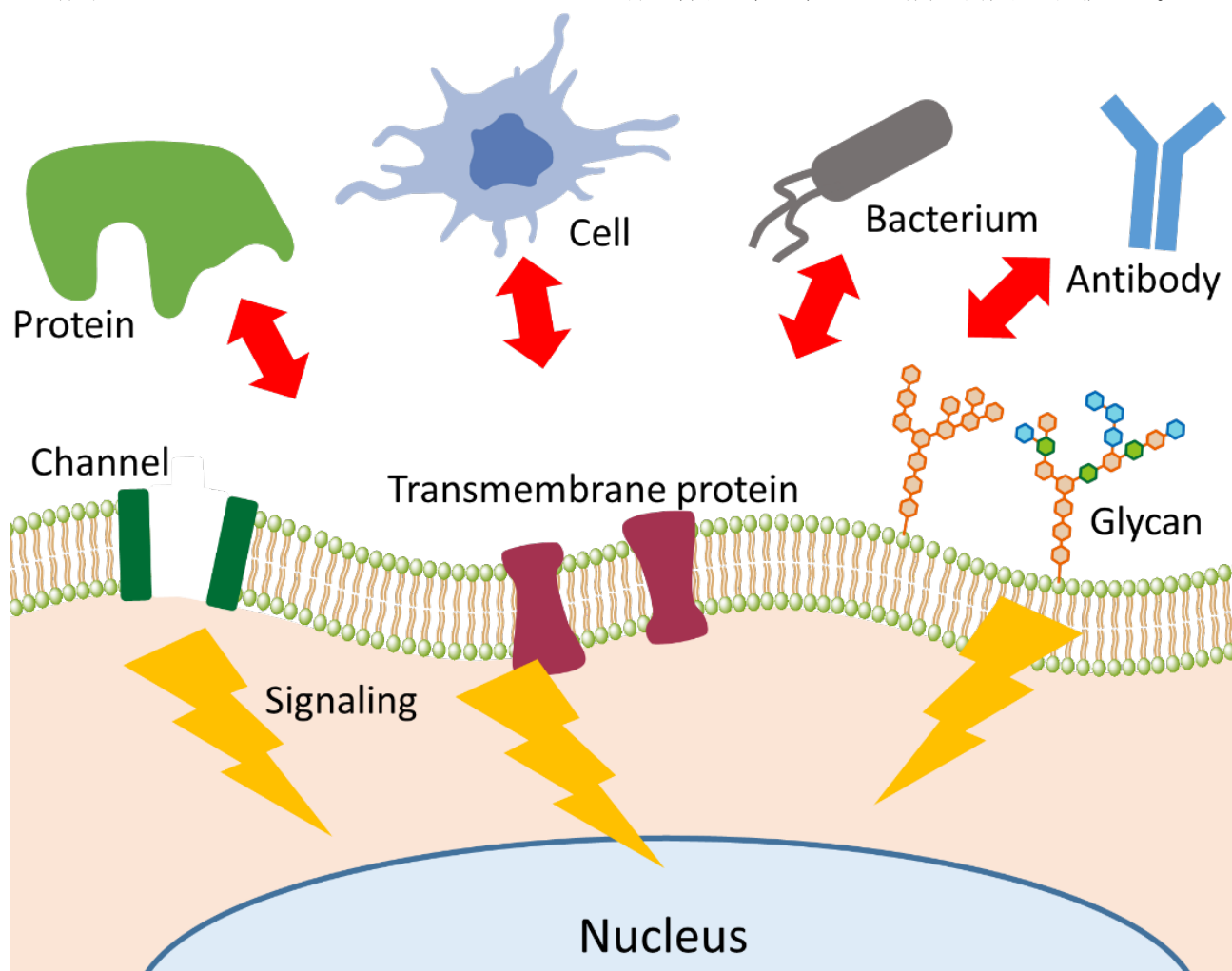


Figure 1 Schematic illustration of molecular recognition mechanism on the cell membrane.

2章 アポトーシス細胞膜を模倣した抗炎症活性を有する高分子の設計

まず本章では、キーマテリアルとなるホスファチジルセリンやアポトーシス細胞の生理活性、及び研究背景について述べ、次いでホスファチジルセリン含有高分子の合成について述べる。

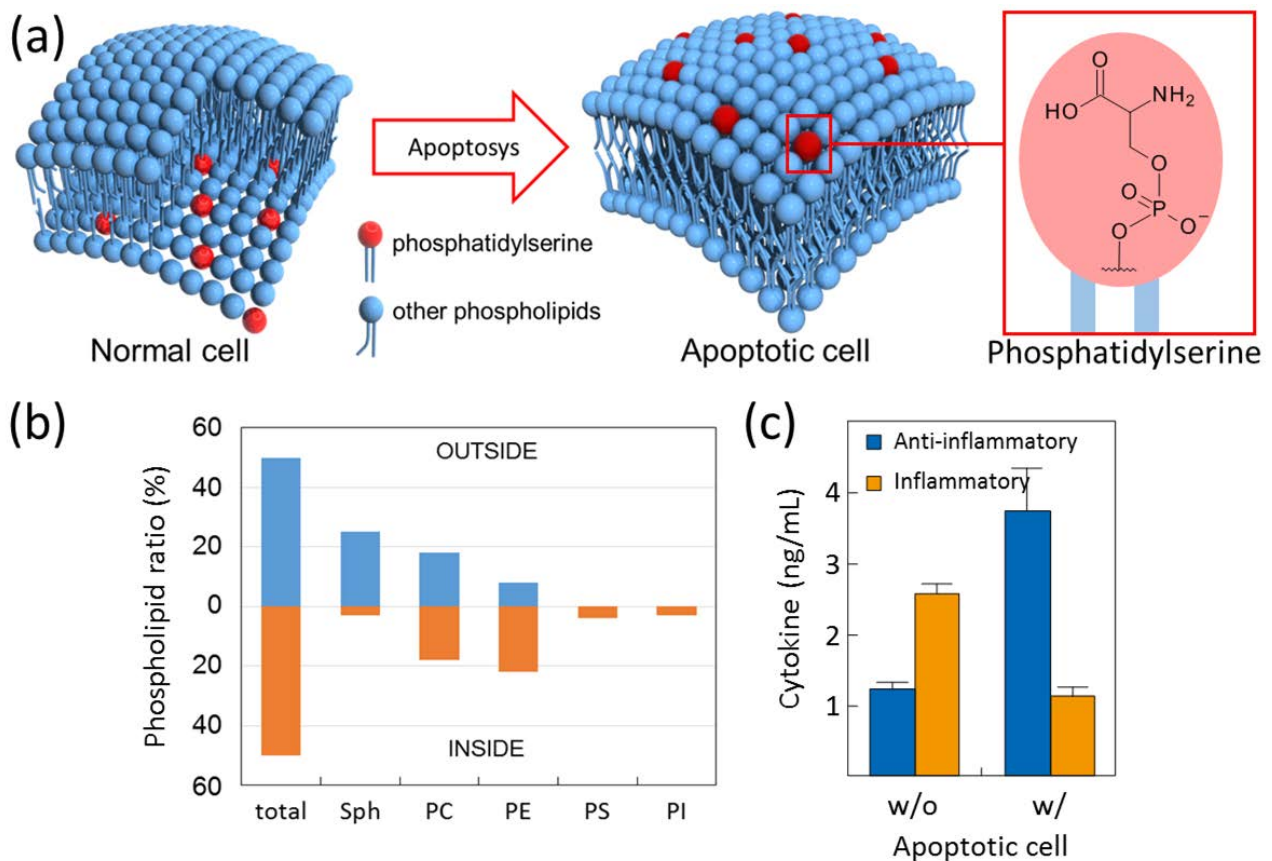
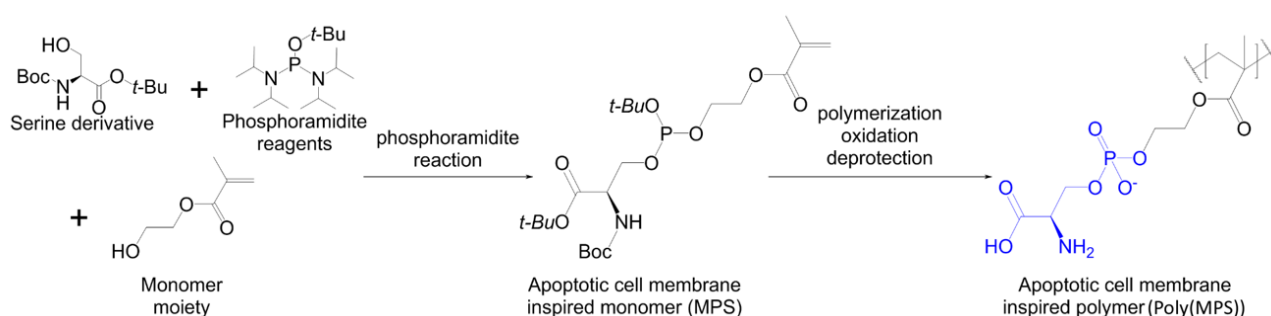


Figure 2 (a) Schematic illustration of membrane structures on normal and apoptotic cells. (b) Difference of phospholipid ratio on normal cell's membrane. (c) Anti-inflammatory effect of apoptotic cell.

ホスファチジルセリンとは細胞膜を構成するリン脂質の一員であるが、通常時は細胞膜の内側にのみ局在している(Figure 2 (a), (b))。これは、ホスファチジルセリンがマクロファージや樹状細胞に対して”Eat Me シグナル”としての生理活性を有することに起因しており、生体におけるホスファチジルセリンの発露は厳密に制御されている。このホスファチジルセリンが能動的に提示される唯一のタイミングは細胞がアポトーシスを引き起こす段階であり、マクロファージが Eat Me シグナルであるホスファチジルセリンを提示した細胞を認識した場合、速やかにこれを貪食、除去する。アポトーシスとは遺伝的にプログラムされた高度な制御機構による能動的な細胞死であり、生物個体の発生・恒常性の維持に必須の意義と役割を持った細胞死形態として知られており、その最も注目すべき特徴は細胞死の過程において炎症反応を惹起しないという点である。従来、アポトーシス細胞の非炎症的な細胞死は免疫細胞による貪食作用のみによって説明されてきたが、近年ではアポトーシス細胞が能動的な炎症反応抑制機構を有することが明らかとなってきた。具体的には、マクロファージがアポトーシス細胞を認識した場合、アポトーシス細胞の貪食に伴う炎症性サイトカインの減産と抗炎症性サイトカインの増産が報告されている(Figure 2 (c))。このアポトーシス細胞の認識、及び抗炎症活性の発現には前述の通りホスファチジルセリンが関与していることが知られており、アポトーシス細胞を用いずにホスファチジルセリンリポソームを用いた場合でも同様の抗炎症活性が発現することが様々な研究者によって報告されている。

このようにアポトーシス細胞・及びホスファチジルセリンは抗炎症活性を有することが明らかとなっているが、アポトーシス細胞や、ホスファチジルセリンリポソームによる臨床応用を考えると、安全性の担保やコスト面において実現的ではない。そこで我々は、ホスファチジルセリンの頭部基であるホスホリルセリン基を側鎖・末端に含有するような高分子材料を創出することで、アポトーシス細胞と同様の作用機序による

抗炎症治療を材料のみによって達成できると考え、ホスホリルセリン(PS)基含有有効分子の設計に至った。



Scheme 1 Synthetic scheme of apoptotic cell membrane inspired monomer and polymer.

本章では、PtdSerの頭部基であるPS基を側鎖に持つようなメタクリル系モノマーの設計を行った。基本的に、高分子を機能化する場合のロードマップは二種類あり、予め調製した高分子に対して機能性官能基を導入する手法と、機能性官能基を有するモノマーを合成しておき、これを対象のモノマーと共重合するという2つの道筋が存在する。この観点から言うと、2章は后者であり、3章の道筋は前者である。

PS基含有モノマー(MPS)はDNAの固相合成に用いられるホスホロアミダイト法にて合成した。簡潔に述べると、乾燥 dichloromethane 中で、*N*- α -(*tert*-butoxycarbonyl)-*L*-serine *tert*-butyl ester、*tert*-butyl tetraisopropylphosphordiamidite、及び 2-hydroxyethyl methacrylate を imidazole hydrochloride 存在下で当量反応を行い、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製を行うことで透明粘調体の MPS を得た(Scheme 1)。得られた MPS の化学構造は ^1H NMR, ^{13}C NMR, ^{31}P NMR, MS, によってそれぞれ評価を行った。結果として、全ての測定において予測値とほぼ同等の値を得たため、MPS の有意な合成が確認できた。次に、MPS をフリーラジカル重合にて重合することで poly-MPS の合成を試みた。熱安定試験によって MPS は 40°C 以上の条件では比較的不安定であることが確認できていたため、10 時間半減期温度が 30°C である V-70 を重合開始剤として用いて DMF / Ethanol 溶媒にて重合反応を行い、酸化、脱保護反応を経て poly-MPS を得た。Poly-MPS の重合、酸化、脱保護については ^1H NMR, ^{31}P NMR, GPC によって有意に進行していることを確認した。

次に、poly-MPS の生理活性を評価した。まず、poly-MPS の細胞毒性を評価した。評価手法として、RAW 264.7 と HeLa に対して 0-50 mM の濃度で poly-MPS を播種し、24 時間後の細胞生存率を Alamar Blue Assay にて評価した。結果として、poly-MPS は全ての濃度領域において高い細胞生存率を示し、poly-MPS の優れた生体適合性が明らかとなった。次に、poly-MPS の用量依存的な炎症抑制効果を評価した。炎症性刺激として LPS を添加した場合の RAW Cell における NF- κ B(炎症性核内転写因子)の発現量を SEAP reporter gene assay にて定量することで評価を行った。0-50 mM の濃度域で poly-MPS を添加した際、poly-MPS が用量依存的、特に 10 mM 以上の濃度で有意に NF- κ B の発現量を制限することが明らかとなった(Figure 3 (b))。これらの結果はマクロファージの生理活性を損なうことなく炎症性の核内転写因子である NF- κ B の発現を抑制したことを意味している。

また、LPS を添加した場合の RAW Cell はアメーバ様伸展を示す事が確認できたが、ここに poly-MPS を添加した際にはこのアメーバ様伸展が抑制されることを著者は見出した。マクロファージのアメーバ様伸展は炎症刺激に伴う事が報告されており、特にマクロファージコロニー刺激因子の添加によって顕著に引き起こされる事が知られている。つまり、このマクロファージの幾何学的形状変化も poly-MPS の抗炎症活性の発露を支持している。更に著者は、共焦点顕微鏡を用いて蛍光標識 poly-MPS の RAW Cell における局在位置や1細胞に対する分配量を明らかとした。マクロファージは PtdSer レセプターをその表面に有するため、Poly-MPS をマクロファージへと播種した場合、poly-MPS はマクロファージ表面に固着するか、それを介して貪食されることが予想される。結果として、蛍光標識した poly-MPS はマクロファージの細胞質中に分配することが共焦点顕微鏡象より明らかとなった(Figure 3 (a))。また、1細胞に対する poly-MPS の分配量も

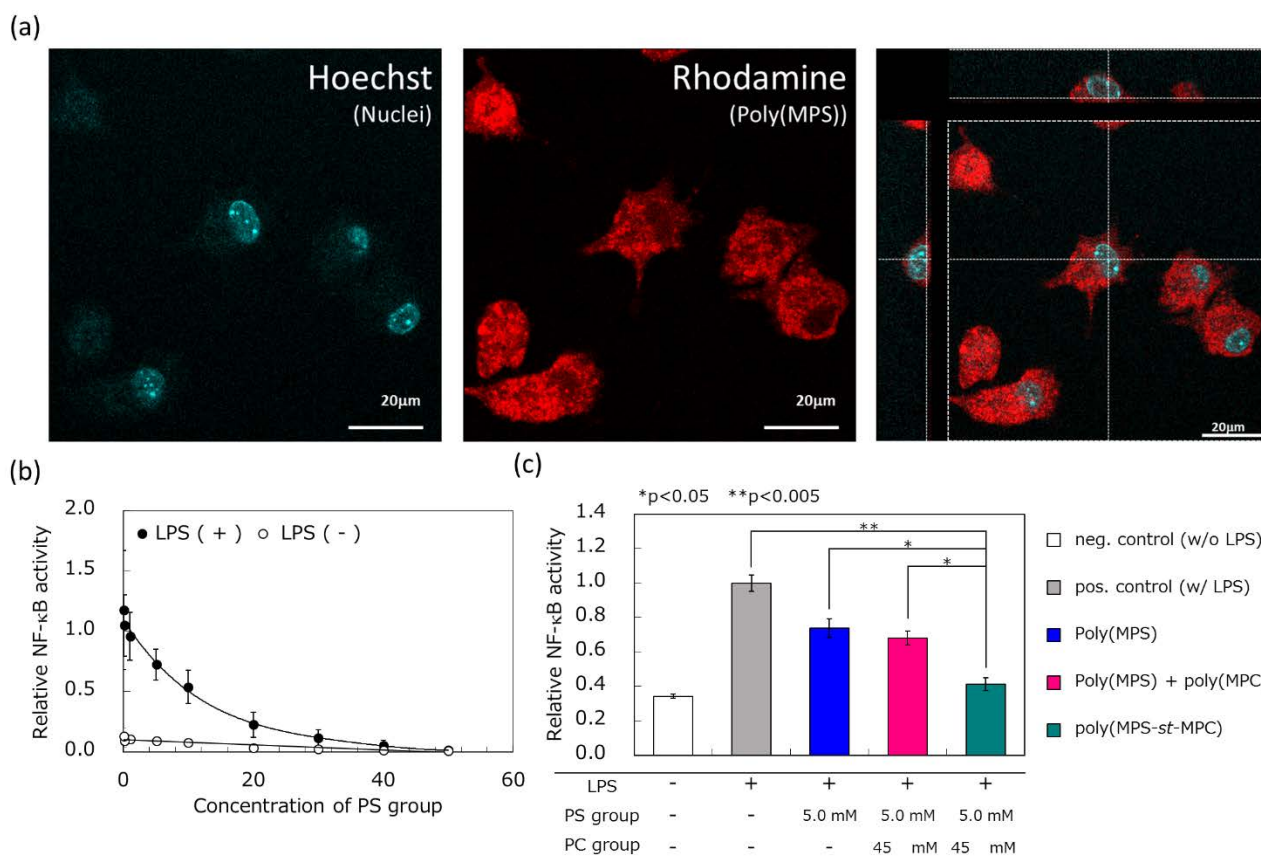


Figure 3 (a) Confocal microscope images of the RAW cells with rhodamine-modified poly(MPS). (b) Dose-dependent immunosuppressive effect of poly-MPS. (c) Comparison of the immunosuppressive effects of apoptotic cell-inspired polymer in different polymeric conformation.

系中に添加する高分子の量に依存して上昇傾向が確認できるが、濃度にして 40mM に達した際に飽和を迎えることが明らかとなった。また、この結果から 1 細胞への poly-MPS 分配量と抗炎症活性の発現には一定の相関が存在し、明確な閾値(50 pg/cell)が存在することが明らかとなった。この閾値はそれ単体では意味を持たないが、今後 poly-MPS の抗炎症活性の効率化を志向する場合に一定の基準値として重要な値となる。また、poly-MPS の共培養時間に依存した抗炎症活についても評価し、poly-MPS の抗炎症性の発現には少なくとも 1 時間の共培養が必要であるということが明らかとなった。これらの結果から、著者は poly-MPS(アポトーシス細胞模倣高分子)がマクロファージに認識された場合、高分子自体がマクロファージに取り込まれると同時に、マクロファージの炎症刺激への応答性を抑制するというを確認した。この免疫抑制挙動は実際のアポトーシス細胞の挙動と類似しており、炎症性刺激を加える前に予め抗炎症刺激を加えなければならない点なども類似点として挙げられる。

本章の最後に著者は、実際の細胞膜におけるホスファチジルセリンが占める割合が約 10%であるという点に着目し、PS 基含有高分子がより厳密にアポトーシス細胞模倣を模倣するよう 90 mol% の MPC(2-Methacryloyloxyethyl phosphorylcholine; ホスファチジルコリン模倣モノマー)とランダム共重合体である poly(MPS-*st*-MPC)を作製し、ホスホリルセリン濃度を統一した際の抗炎症活性の誘導効率を評価した(Figure 3 (c))。poly-MPS, poly-MPS と poly-MPC の混合条件(混合比 1:9)、poly(MPS-*st*-MPC) (重合比 1:9)の 3 条件でそれぞれホスホリルセリン基の濃度が 5mM となるよう先述の RAW 264.7 の炎症モデルに播種した結果、MPS と MPC のランダム共重合体(poly(MPS-*st*-MPC))のみが有意に NF-κB を抑制するという結果を得た。この結果は、抗炎症作用という観点では、よりアポトーシス細胞に近い構造を有する高分子材料がより優れた結果を示すということを示しており、アポトーシス細胞模倣高分子の分子設計の重要度を示

本章では、アポトーシス細胞に特異的な膜構造を模倣したホスホリルセリン含有高分子を、モノマーの段階から合成することに成功し、同時に炎症抑制効果を有することを明らかとした。加えて、ホスホリルコリン基含有モノマーである MPC とランダム共重合することで作製した、よりアポトーシス細胞に近い構造を有する poly(MPS-*st*-MPC)がより優れた抗炎症活性を発現しうることも明らかとした。この傾向は、今後当高分子のさらなる高機能化を図る上で重要な知見となりうる。

2章では、メタクリル系モノマーである HEMA に対して、PS 基を導入した MPS モノマーを合成し、その抗炎症活性を評価した。加えて、ホスファチジルコリン模倣モノマーである MPC とのランダム共重合体は MPS 単体のホモポリマーと比してより効率的に抗炎症活性を誘導した。これら結果は MPS を活用する上でラジカル重合可能なコモノマーと併用する上では大きな利点であるが、メタクリル系モノマーであるが故に、非ラジカル系の高分子材料へ対する応用は不可能であった。例えば PEG (poly ethylene glycol)や Pluronic (poloxamer)、PCL(poly caprolactone)は優れた生体適合性や生分解性から、生体内で活用する様々なアプリケーションにて使用されているが、アポトーシス細胞模倣部位の導入は 2 章の成果を用いて達成することは不可能である。

Poloxamer

- **Water soluble**
- **Terminal modification**
- **Biocompatible**

NIPAAm based copolymer

- **Water soluble**
- **Side chain modification**
- **Stimuli-responsive**

PCL

- **Water insoluble**
- **Terminal modification**
- **Biodegradable**

BMA-HEMA copolymer

- **Water insoluble**
- **Side chain modification**
- **Biocompatible**

tetraisopropylphosphorodiamidite + N^{α} -(*tert*-Butoxycarbonyl)-L-serine

 Reagents: Imidazole hydrochloride, Dichloromethane, N_2 , r.t.

 (polymer) --OH

 Reagents: Imidazole hydrochloride, Dichloromethane, N_2 , r.t.

 Reagents: *tert*-Butyl hydroperoxide, Dichloromethane, r.t.

 (polymer) $\text{--O--P(=O)(O-}t\text{-Bu)}_2$

 Reagents: Trifluoroacetic acid (TFA), Dichloromethane, r.t.

 (polymer) $\text{--O--P(=O)(O-}t\text{-Bu)}_2$

A bar chart showing NF-κB activity (Y-axis, 0 to 120) for two polymers: poly(NIPAAm-st-HEAAM) (blue bars) and poly(NIPAAm-st-HEAAM)-PS (orange bars). The X-axis shows concentrations: Ctrl, 1 μg/mL, 10 μg/mL, 100 μg/mL, 1 mg/mL, and 10 mg/mL. Error bars represent standard deviation.

Concentration	poly(NIPAAm-st-HEAAM)	poly(NIPAAm-st-HEAAM)-PS
Ctrl	~95	~102
1 μg/mL	~85	~82
10 μg/mL	~75	~82
100 μg/mL	~75	~82
1 mg/mL	~65	~22
10 mg/mL	~20	~18

Figure 5 Immunosuppressive effect of PS modified NIPAAm copolymer

tetraisopropylphosphordiamidite を dichloromethane 中で反応を行った。得られた高分子に対して 3 当量の *tert*-butyl peroxide を用いてリン原子を酸化し、次いで 3 当量の trifluoroacetic acid と反応することで脱保護反応を行った(Scheme 2)。

得られた 4 種の高分子を ^{31}P NMR によって測定した結果、いずれのスペクトルにもリン酸エステル由来のピークを確認し、ホスホロアミダイト法が有意に進行していることを確認した。また、 ^1H NMR 分光法によって PS 基の導入率を算出した結果、poly(ϵ -caprolactone), poloxamer, poly(BMA-*st*-HEMA), poly(NIPAAm-*st*-HEAAm)に対する導入率はそれぞれ、69.6%、14.1%、81.9%、84.6%であった。

また、得られた PS 修飾 poly(NIPAAm-*st*-HEAAm) (poly(NIPAAm-*st*-HEAAm)-PS)の RAW 264.7 における用量依存的な細胞毒性を Alamar Blue Assay にて、抗炎症活性を SEAP reporter gene assay にて測定した(Figure 5)。結果として、1mg/mL の濃度域における低細胞毒性と NF- κ B 活性の抑制を同時に確認した。NF- κ B は炎症のプロモーターの役割を果たす転写因子であるため、RAW 264.7 における NF- κ B の抑制は炎症活性の抑制を意味している。本項における到達点は、①種々の反応高分子が有する水酸基に対して PS 基を導入することに成功した点、②得られた PS 修飾高分子は優れた生体親和性を示しながらも、濃度に依存して抗炎症活性を発現したという 2 点である。

4 章 糖認識機能を有するレクチン模倣高分子の作製

本章で著者は、生体において糖鎖・レクチン相互作用が炎症、胚発生、細胞発生、および腫瘍進行などの多くの生物学的プロセスにおいて重要な役割を演じることに着目し、糖認識機能を有する高分子を作製し、その基本的な糖認識機能の評価を行った。レクチンとはある特定の構造を有する糖鎖を特異的に認識するタンパク群の総称である。レクチンはその優れた糖認識機能からガンや慢性疾患の検出に有効であるといった実用的な研究成果も報告されるようになって来ている。しかし、タンパク質骨格であるが故に分子設計に限界がある。著者は、非タンパク質性の合成レクチンを創出することを目的として、cis-diol と選択的に共有結合を形成する能力を有する benzoxaborole 基に着目した。通常、糖を認識する官能基としてはフェニルボロン酸(PBA)が知られており、PBA を用いた糖認識は非常に有望なアプローチであるが、PBA-糖相互作用は生理的な pH(pH=7.4)では sp^2 混成軌道の形成が支配的であるため糖への結合が脆弱であるという難点を抱えていた。しかし、Benzoxaborole 基はホウ素を含む歪んだ C5 環状構造によって生理的 pH(pH=7.4)においてもホウ素原子の混成軌道が sp^3 支配を維持することが可能であるため、生理的 pH における糖-ホウ素原子の強い相互作用の維持を実現している。¹ 以上を踏まえ、著者は Benzoxaborole 基に重合性官能基を付加した Benzoxaborole モノマー(MAAmBO; 5-methacrylamide-1,2-benzoxaborole)を設計し、これを温度応答性高分子である NIPAAm(*N*-isopropyl acrylamide)との共重合体(poly(NIPAAm-*st*-HEAAm-*st*-MAAmBO))を作製した(Scheme 3, Figure 6 (b))。

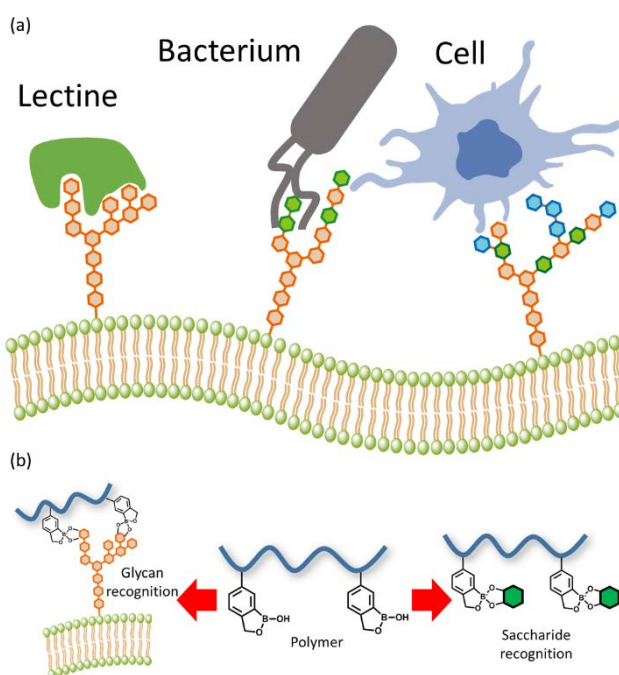
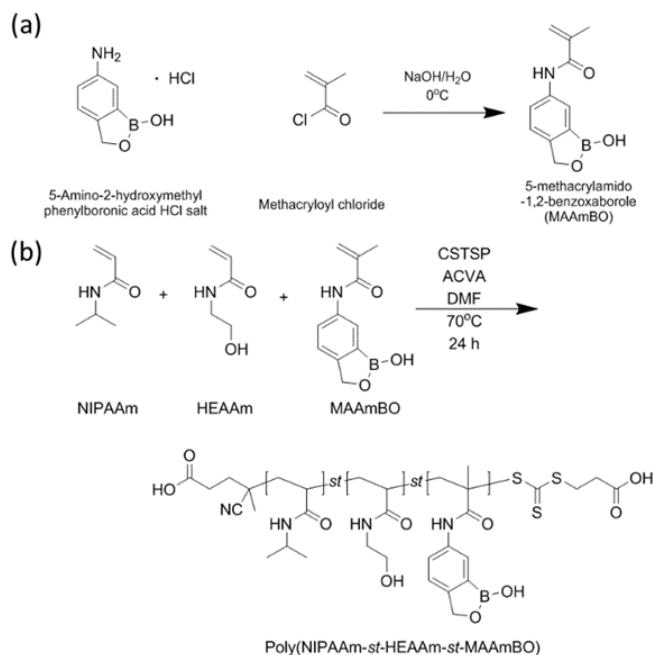


Figure 6 Schematic illustration of (a) biomolecules recognition by cell-surface sugar chain (b) sugar recognition by MAAmBO pendant polymer.

作製した高分子の主要構成成分は NIPAAm から成り立っており、NIPAAm は温度に応答して水へ対する相溶性を大きく変化させる挙動を示すことが知られており、また、その際の温度は高分子鎖の親水性に大きく影響をうけることが知られている。これを踏まえ、得られた高分子を PBS 中に溶解し、単糖(D-glucose、D-fructose、D-psicose)を種々の濃度で添加し、加温していった際の PBS に対する相溶性の変化を追跡した。具体的には、加温する際に波長 $\lambda=500\text{nm}$ の参照光を照射し、透過光強度が 50%に減衰した温度を曇点(T_{CP})と定義し、この T_{CP} の変化量によって高分子と糖の相互作用の強度を議論した。まず、高分子溶液に対して D-glucose、D-fructose、D-psicose をそれぞれ 10mg/mL の濃度で添加した場合の濁度変化を追跡した。溶液温度が 30°C の場合は全ての条件で溶液は透明であったが、温度の上昇に伴って無添加、D-glucose、D-fructose、D-psicose の順に白濁していった。また、Figure 7 では糖種・濃度依存的な高分子溶液の T_{CP} (Cloud point)を示した。濃度 10mg/mL における D-glucose、D-fructose、D-psicose の T_{CP} 変化量(ΔT_{CP})はそれぞれ、6.8°C、22.7°C、42.9°C であった。この傾向は、D-プシコースが MAAmBO に対して最も高い親和性を有することを示唆している。次に、Benzoxaborole 基の光学活性識別能についてグルコース誘導体を用いて評価した。結果として、D-glucose、L-glucose、どちらを添加した高分子溶液においても、同様の温度依存濁度変化プロファイルを示した。このことは、MAAmBO が光学活性を認識し得ないということを示す結果である。一方で、通常のグルコースよりも一つ水酸基が少ない 2-deoxy-D-glucose を添加した条件では、糖未添加群と同様の濁度プロファイルを示した。通常のグルコースは、4つの水酸基を有し、組み合わせとして、3組の cis-diol を有しているが、2-deoxy-D-glucose では2位の水酸基が失われているため、cis-diol は1組のみしか存在していない。この構造上の差が、2-deoxy-D-glucose が MAAmBO に対して相互作用を示さない原因であると考えられる。また、MAAmBO の2糖、3糖への相互作用強度も評価した。D-glucose、D-maltose、D-trehalose、isomaltotriose(10mg/mL)の T_{CP} はそれぞれ 41.4°C、34.5°C、34.4°C、36.6°C ($\Delta T_{CP}=6.8$ 、-0.3、-0.2、1.8) であった。興味深いことに、2糖、及び3糖は単糖と比べて ΔT_{CP} が小さいことが明らかとなった。この原因として、本実験系は添加する糖の量を質量で固定していたため、同じ質量の糖を加えていても、系中の糖分子の数に差が生じたことが原因として考えられる。



Scheme 3 Synthesis of (a) MAAmBO and (b) poly(NIPAAm-*st*-HEAAm-*st*-MAAmBO)

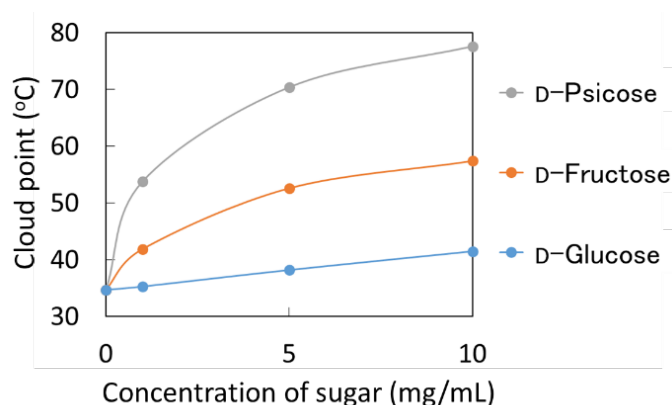


Figure 7 Dose-dependent shift of cloud point of poly(NIPAAm-*st*-HEAAm-*st*-MAAmBO).

最後に著者は、複合糖質マイクロアレイを用いて作製した高分子と計 98 種の糖鎖との相互作用強度を測定した。Figure 8 にその一例を示す。例えば、GP (ヒトグリコホリン) はネガティブコントロール (Negative PAA) と同様の親和性を示したが、Asialo-TF は約 100 倍の親和性を示した。また、CSA (コンドロイチン硫酸) および HS (へパラン硫酸) のようなムコ多糖類も MAAmBO と相互作用することを示し、Negative PAA と比較して約 40 倍の親和性を示した。トランスフェリン (TF)、アシアロトランスフェリン (Asialo-TF) およびアガラクトトランスフェリン (Agalacto-TF) については、興味深い結合強度の傾向が観察された。トランスフェリンは N 型糖鎖を表面に担持する糖タンパク質である。アシアロトランスフェリンは、アシアロ化 (末端脱シアル酸化) された N 型糖鎖を有するトランスフェリンであり、アガラクトトランスフェリンは、末端ガラクトースとシアル酸が除去された N 型糖鎖を担持する糖タンパク質である。傾向として、天然のトランスフェリンと比してアシアロ化されたトランスフェリンは約 2.5 倍の親和性を示したが、アガラクト化したトランスフェリンでは天然トランスフェリンと同様の親和性を示した。この結果は単純に MAAmBO とガラクトースの高親和性を示唆するものであるが、一方でガラクトース担持アレイ (aGal) に対して良い親和性を示していない。このような結果から、MAAmBO はトランスフェリン上のアシアロ化された N 型糖鎖と特異的に識別するということを示唆するものであると考えられる。

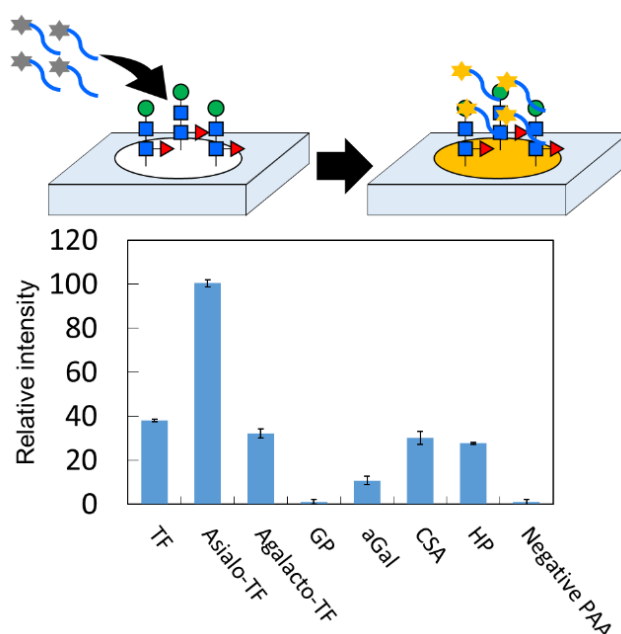
本章では、温度応答性高分子の速やかな相転移挙動と Benzoxaborole 基の糖認識機能を組み合わせることで、棟種・添加濃度に応じた温度依存濁度プロファイルを測定することに成功し、MAAmBO が単糖、2・3 糖に対する親和性を評価することに成功した。加えて、複合糖質マイクロアレイを用いることで実際に生体内に存在している種々の糖鎖に対する親和性について一定の知見を得ることに成功した。

5 章 結言

本論文では、細胞膜上の分子認識機構を介して生理機能を制御可能な高分子の設計を行い、細胞の生理活性を制御しうる高分子の創製に成功した。その結果を以下にまとめる。

2 章では、アポトーシス細胞が有する抗炎症部位 (PS 基) を側鎖に有するメタクリル系モノマー (MPS) の合成に成功した。また、MPS の重合体である poly-MPS の合成にも成功した。Poly-MPS をマクロファージに播種した場合、抗炎症活性が発現するということが確認した。加えて、MPS と MPC (ホスファチジルコリン模倣モノマー) とランダム共重合が可能であるということを示し、MPS と MPC のランダム共重合体がより優れた抗炎症活性を有するということも明らかとなった。この結果はアポトーシス細胞模倣高分子を合成する上で、高度な分子設計が可能であることを示すと同時に分子設計の重要性を示す結果となった。

3 章では、抗炎症活性を有するホスホリルセリン基 (PS 基) をラジカル重合不可能な高分子に対して簡便に導入する手法を確立した。同時に作製した PS 導入高分子が抗炎症活性を有することを明らかとした。本章の成果は PCL や PEG、Poloxamer 等の非ラジカル重合系でありながら優れた生体応用例のある高分子材料に対する効率的な機能付加 (抗炎症活性の付加) が可能であるということを示唆する結果であり、2 章の結果と合わせるとバイオマテリアルとして活用されている既存の高分子の殆どを補完しており、本手法の有用性



Scheme 8 Specificity profiling of Cy3-labeled benzoxaborole pendent polymer.

を示した。

4章では、糖認識機能を有する高分子を作製し、単糖、二糖、三糖、及び糖鎖に対してそれぞれ親和性を有することが明らかとなった。特に、単糖、二糖、三糖における認識の種類・濃度依存性の知見を得た。また、実際の細胞膜上に担持されている種々の糖鎖(計 98 種)に対する特異的認識能についても評価し、今回作製した高分子が人工レクチンとしての有用性が明らかとなった。

これまでの生体材料開発において材料自身が生理活性を有するというコンセプトは稀有であったが、本論文は一定のレベルでこのコンセプトを実現した。今後は、抗炎症効果や糖認識機能を有する高分子が様々な疾病の治療に応用展開することが期待される。また、“材料による治療”という概念のさらなる普及を期待する。